

---

## 学位論文

---

### ラット顎下腺アクアポリン5および1発現に対する 自律神経切除および塩酸セビメリン投与の影響

李 雪飞

キーワード：アクアポリン，自律神経切除，塩酸セビメリン，カテプシン

### Effects of Autonomic Denervation and Administration of Cevimeline Hydrochloride on the Expressions of Aquaporin 5 and Aquaporin 1 in the Rat Submandibular Gland

Xuefei LI

**Abstract : [Purpose]** The present study aimed to explore the role of autonomic nerves on the regulation of the expression of water channels, aquaporin 5 and aquaporin 1 (AQP5 and AQP1, respectively) in the submandibular gland (SMG) of rats.

**[Methods]** Cervical sympathetic trunk denervation (CSTD) or chorda tympani denervation (CTD) was performed on 7-week-old male SD rats. From the 15th day after operation, cevimeline hydrochloride (10 mg/kg) or pilocarpine (0.3 mg/kg) or chloroquine (50 mg/kg) was administered orally into CTD rats everyday for 7 days. Protein and mRNA levels of AQP5 and AQP1 in the SMG were determined by Western blotting, Northern blotting, and RT-PCR. Activities of cathepsins and proteasomes, the enzyme involved in the protein degradation system, were measured using isolated acinar cells as well as the whole SMG tissue.

**[Results]** Expression levels of AQP5 and AQP1 were not affected significantly at 4 weeks although the gland weight decreased to 80% of the control by CSTD; However, by CTD both the SMG weight and AQP5 protein level had decreased, while the AQP1 protein level had not. On the other hand, the AQP5 mRNA level was not affected by CTD. Cevimeline hydrochloride, an M3 receptor agonist, recovered the AQP5 protein level which had been reduced by CTD, and increased the AQP1 protein level to more than the control level. Oral administration of pilocarpine showed no effect on the protein levels of AQP5 and AQP1. The AQP5 mRNA level of SMG in the CTD rat was not affected by the administration of cevimeline hydrochloride. The activity of cathepsin D/E was increased by CTD and this increase was inhibited by cevimeline hydrochloride. Submandibular acinar cells were isolated by Percoll gradient centrifugation from rats that received CTD and/or CTD *plus* cevimeline hydrochloride. Changes of cathepsin D/E activities by CTD and cevimeline hydrochloride were also observed in the isolated cells. Further, the administration of chloroquine, a denaturant of lysosome, recovered the AQP5 protein level decreased by CTD, suggesting the involvement of lysosomal enzyme(s) in the reduction of AQP5 protein level by CTD.

**[Conclusion]** The autonomic regulation of the AQP5 protein level in rat SMG is suggested to be controlled by the lysosomal system, not by transcriptional regulation.

## 緒 言

アクアポリン (AQP) は微生物から動植物まで広く分布する水チャネルで、これにより生体膜を隔てた水移動が浸透圧勾配依存的に行われる。水チャネル AQPs はファミリーを構成し、現在までに13種類のメンバーが存在することが知られている<sup>1-6)</sup>。AQPs は細胞膜に存在し、選択的に水、あるいは水とグリセロールや尿素などの小分子を輸送する。

AQPs は細胞膜を6回貫通しているセルペンチン型膜蛋白質で、分子内のループBとループEにファミリー間で良く保存されたNPAモチーフがそれぞれ1カ所ずつ存在する。これらはヘミチャネルを形成し、水はこの部位を通過することが明らかにされている<sup>7-13)</sup>。AQPs は構造の特徴と機能によって主として二つの亜群に分類されている。AQP 0, 1, 2, 4, 5, および6は典型的な水選択性チャネルとして、またAQP 3, 7, および9はアクアグリセロポリンとして知られている<sup>14)</sup>。アクアグリセロポリンは水以外にグリセロールも輸送する。これらAQPs は存在する器官・部位がそれぞれ異なる。たとえば、AQP1は全身のさまざまな組織に分布するが、AQP2は腎臓の集合管と内耳の細胞にのみ局在する<sup>15, 16)</sup>。また、AQP2はバソプレッシンなどの内分泌ホルモンの刺激により短時間 (およそ40 min) で細胞膜へ移動し (トランフィッキング)、細胞膜と融合することが知られている<sup>17)</sup>。さらに、AQP2の発現はこれらのホルモンによっても調節されている<sup>18-20)</sup>。腎臓集合管細胞に存在するAQP2はバソプレッシンの長時間処理 (1日以上) によって、その発現量が上昇する<sup>21, 22)</sup>。AQP5は顎下腺、舌下腺、耳下腺などの唾液腺の他、涙腺、気管支、目、肺、および十二指腸などの細胞に局在するが、腎臓や脳には存在しない<sup>12, 23, 24)</sup>。Maらは野生型マウスと比べて、AQP5ノックアウトマウスではピロカルピンで惹起された唾液の分泌量が60%以上減少することから、AQP5が唾液の分泌に重要な役割を果たしていることを報告した<sup>25)</sup>。同様の現象は変異型AQP5を有するラットにおいても見出された<sup>26)</sup>。

AQP2の例のように、AQPsの発現・機能のホルモンによる調節については比較的よく研究されている。一方、AQPsの発現に対する自律神経系による調節についてはこれまでほとんど研究されていない。唾液腺は交感神経と副交感神経によって二重支配されている<sup>27)</sup>。すなわち顎下腺と舌下腺は上唾液核由来の、また耳下腺は下唾液核由来の副交感神経にそれぞれ支配されている。また、上位胸髄に由来する交感神経は三大唾液腺を支配している。通常、副交感神経性の刺激は交感神経性のそれより多量の唾液分泌を引き起こす。以上のことから、唾液腺AQPの発現や細胞内輸送が神経系・神経伝達物質により調節されている可能性が考えられ、これを検証する目的で、本研究に着手した。

本研究では、ラットにおけるAQP5発現レベルに対

する交感神経と副交感神経の切除、さらにM3ムスカリンアゴニストである塩酸セビメリン投与の影響を解析した。

## 材料並びに方法

### 1. 試薬類

抗AQP5抗体 (抗血清) および抗AQP1抗体 (抗血清) は本研究室において作製した<sup>24, 28)</sup>。アプロチニン、アガロースS、クロロキシン、ヒアルロニダーゼ、フェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF)、およびピロカルピンは和光純薬工業株式会社 (大阪) より、プロテインアッセイ染色液はBio Rad (Hercules, CA) より、コンプリートEDTAフリープロテアーゼインヒビターカクテル錠、およびジゴキシゲニン (DIG) 発光検出キットはRoch (Mannheim, ドイツ) よりそれぞれ購入した。塩酸セビメリンは第一製薬株式会社 (東京) より供与された。100 bp DNA ラダーサイズマーカーはNew England Biolabs (Beverly, MA) より、ジメチルスルホキシド (DMSO)、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、Tri-reagent、および沃化プロピディウムはSigma (St. Louis, MO) よりそれぞれ購入した。ECL ウェスタンブロットング検出試薬およびPercollはAmersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK) より、ロイペプチン、ペプスタチンA、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA、Z-Arg-Arg-MCA、7-amino-4-methylcoumarin (AMC)、MOCac-Pro-Leu-Gly、MOCac-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys (Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>、MOCac-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys (Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>、などの酵素活性測定用の蛍光基質および消光性蛍光基質はペプチド研究所 (大阪) よりそれぞれ購入した。3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS) は同仁化学研究所 (熊本) より、SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum® Taq systemはInvitrogen Corporation (Carlsbad, CA) より購入した。富士RX X-線フィルムは富士フィルム株式会社 (神奈川) より購入した。

### 2. 動物と処置

実験には日本SLC (静岡) から購入した7週齢、体重が170~190 gのSD系ラットを用いた。前報<sup>26)</sup>のように、購入したラットの約20~30%に変異AQP5遺伝子が認められるため、AQP5正常遺伝子をもつ個体を選出し、本学の動物飼育室にて交配近交化した。動物は06:00~18:00の間、照明下で飼育し、水道水と固形飼料を自由に摂取させた。交感神経切除または副交感神経切除はネンプタル® 麻酔下 (50 mg/kg 体重, *i.p.*) で行った<sup>29)</sup>。切除術は実験により片側または両側に行った。交感神経切除の偽手術群には、頸前皮膚の切開のみを行ったものを用いた。術後4週目に以下の実験に使用した。また、一部の実験では、ピロカルピン (0.3 mg/kg 体重) および塩酸セビメリン (10 mg/kg 体重)、あるいはクロ

ロキソニン (50 mg/kg 体重) を術後15日目から7日間、1日に一回経口投与した。対照群のラットには水を投与した。術後21日目に動物を屠殺し、すみやかに唾液腺 (顎下腺) を摘出し、これを以下の AQP 蛋白質、AQP mRNA レベル分析とカテプシンおよびプロテアソーム活性の測定に用いた。

### 3. Percoll 濃度勾配遠心法による顎下腺腺房細胞の分離

摘出した顎下腺を細切し、0.03% コラゲンナーゼ、250 IU/ml ヒアルロニダーゼ、0.2 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む  $\text{Mg}^{2+}$ -フリーのハンクス-バランス塩溶液 (HBSS バッファー; 1個の顎下腺あたりに 2 ml) 中にて、37°C で15分間、100回/分のストロークで振蕩した。先端部の 2~3 mm を切断した 5-ml チップで、消化した組織を10回程度ピッペティングした。組織サンプルに 5 ml の水冷した  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -フリー HBSS 溶液を加えて、消化反応を停止させ、10分間静置して組織を沈殿させた。上清を捨て、沈殿物を再度、5 ml の水冷した  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -フリー HBSS 溶液に懸濁し、10分間静置した。Vincent と Nadeau<sup>30)</sup> の方法で作製した 65% Percoll の等張  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -フリー HBSS 溶液を冷却し、冷却液 8 ml の上部に 2 ml の懸濁液 (顎下腺 1 個あたり 4 ml に希釈して使用) を重層した。この試料を日立 05PR-22 型遠心機 (日立工機、東京) で 500 x g にて、30分間遠心分離した。分離された二層を回収し、腺房細胞を含む下層を洗浄後酵素活性測定などに用いた。また、分離腺房細胞の純度は顕微鏡による観察で確認すると同時に、カリクレインをマーカーとして、導管細胞の混入度合をウェスタンブロットティングにより検定した。

### 4. 全 RNA の調製と RT-PCR

全 RNA は Tri-reagent を用い、添付のプロトコールにしたがって調製した。RT-PCR は SuperScript™ One-step RT-PCR system を用いて行った。反応液は氷上にて以下の組成のものを調製した。すなわち、12.5  $\mu\text{l}$  の 2x 反応混合液、5 pmol の各プライマー、0.5  $\mu\text{l}$  の RT/Taq、0.5  $\mu\text{g}$  のテンプレート RNA、および 10.5  $\mu\text{l}$  の DEPC 水を混合し、全量 25  $\mu\text{l}$  とした。使用した AQP5 のセンスおよびアンチセンスプライマーはそれぞれ 5'-CCCCCAAGGCACCATGAAAAA-3'、と 5'-TCACGAATCTCTGAGGTCTG-3' で、増幅長は 1074 bp である。AQP1 のセンスおよびアンチセンスプライマーはそれぞれ 5'-ATGGCCAGCGAAATCAAGAAG-3'、と 5'-TTTGGGCTTCATCTCCACCC-3' で、増幅長は 813 bp である。増幅反応は以下のように行った。すなわち、45°C、30分の RT 反応を行った後、94°C、15秒の変性反応、55°C、30秒のアニーリング、72°C、1分30秒の伸長反応のサイクルを 35 回くり返し、最後のサイクルの後、72°C、5分の伸長反応を行った。反応終了後、2  $\mu\text{l}$  の PCR 産物を用いて TAE バッファーを含む 3% アガロー

スゲル電気泳動により解析した。

### 5. ノーザンブロットング

全 RNA 20  $\mu\text{g}$  を 1x MOPS 溶液 (20 mM MOPS, 5 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA, pH 7.0), 50% フォルムアミド, 6.4% フォルムアルデヒド, および 5.3% グリセリンを含むサンプルバッファー 20  $\mu\text{l}$  に溶解した。RNA サンプルは 95°C で 2 分間加熱し、ただちに水冷後、1% 変性アガロースゲルにレーン当たり 10  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{g}$ ) のサンプルを電気泳動した。泳動後、分離した RNA を常法により Hybond-N+ 膜に転写した。この膜を、42°C で 3 時間 プレーハイブリダイゼーションした後、同じ温度でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーは 50% フォルムアミド, 2.5x Denhardt's 溶液, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml サケ精子 DNA, 10% デキストラン硫酸, および 50 ng/ml DIG-標識 AQP5 cDNA プローブを含む 5x SSPE (1x SSPE は 150 mM 塩化ナトリウム, 10 mM リン酸ナトリウム, 1 mM EDTA, pH 7.4) を用いた。またプレーハイブリダイゼーションには cDNA プローブを含まない同バッファーを用いた。15時間のハイブリダイゼーションの後、膜を室温 5 分間、42°C 5 分間、それぞれ 1 度ずつ 2x SSPE で洗浄した。この膜をさらに 42°C 20 分間、1x SSPE で 2 回洗浄した。その後、膜を洗浄用バッファー (0.3% Tween-20 および 0.15 M 塩化ナトリウムを含有する、0.1 M マレイン酸バッファー, pH 7.5) で室温 5 分間洗浄し、1% ブロッキング溶液 (DIG-発光検出キット) で 1 時間インキュベーションした後、洗浄用バッファーで 10,000 倍に希釈した抗 Dig-Fab 抗体溶液と室温で 1 時間反応させた。膜を洗浄用バッファーで 15 分間、2 回洗浄し、0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 50 mM  $\text{MgCl}_2$  を含むバッファー (バッファー III) で処理した。次にバッファー III で 100 倍に希釈した CSPD 溶液で 5 分間インキュベーションした後、余分の液体を濾紙で取り除き、膜をハイブリダイゼーションバッグに封入し、37°C で 15 分間、インキュベーションした。その後、ただちに富士 RX X-線フィルムに露光した。

### 6. DIG 標識 cDNA プローブの調製

DIG 標識 AQP5 cDNA プローブは以前報告した方法で合成した<sup>26)</sup>。すなわち、2.5  $\mu\text{l}$  PCR Dig 標識混合液 (10x), 各 5 pmol のセンスおよびアンチセンスプライマー、2 U の TaqDNA ポリメラーゼ、50 pg の AQP5 cDNA (テンプレート DNA; mRNA より前述の RT-PCR により合成し、下記の方法により純化した) および 1x PCR バッファー (宝酒造) を混合し、DEPC 水で最終容量を 25  $\mu\text{l}$  にした反応液を用い、PCR を行った。使用したプライマーは前述と同じものであった。PCR は以下のように行った。すなわち、45°C、30分の RT 反応を

行った後、94°C、15秒の変性反応、55°C、30秒のアニリング、72°C、1分30秒の伸長反応のサイクルを35回繰り返し、最後のサイクルの後、72°C、5分の伸長反応を行った。合成したプローブはアガロースゲル電気泳動により確認・分離し、切り出したゲルをQIAquick spin カラム 50 (Qiagen GmbH, Hilden, ドイツ) を用いて精製した。

#### 7. 全膜蛋白質画分の調製とウェスタンブロットティング

顎下腺を細切後、15 ml ガラスホモジナイザー (Wheaton Science Products, Millville, NJ) を用いて、9倍量の 5 mM HEPES (pH 7.5)、50 mM マンニトール、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM PMSF、1 µg/ml アプロチニン、2 µg/ml ペプスタチン A、2 µg/ml ロイペプチン、およびコンプリート EDTA フリープロテアーゼインヒビターカクテル錠 (溶液25 ml に1錠) を含む氷冷したバッファーでホモジナイズした。ホモジネートはナイロンメッシュ (150 mesh) でろ過後、600 x g の低速遠心分離により核および未破壊細胞を取り除いた。上清をさらに105,000 x g で1時間、遠心分離し、全膜蛋白質を沈殿させた<sup>31)</sup>。沈殿物を上記バッファーに懸濁させ、牛血清アルブミンを標準物として、バイオ-ラッドプロテインアッセイ染色液を用いて蛋白質濃度を測定・算出した。

ウェスタンブロットティングはBio-Rad ミニトランス-ブロット装置 (Mini-Protean® II) を用いて、Towbinら<sup>32)</sup>の方法に従った。すなわち、サンプルローディングバッファー (2% SDS, 10%グリセロール, 0.001% BPB, 0.625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% 2-メルカプトエタノール) とサンプルを1:4で混合し、37°Cで30分間インキュベートし、電気泳動用試料を調製した。レーンあたり5 µg蛋白質を12% SDS ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜へ電氣的に転写した。ブロット膜を洗浄用バッファー (0.05% Tween 20 を含む PBS) に溶解した3% スキムミルク溶液でブロッキングした後、同ブロッキングバッファーで3,000倍希釈した抗 AQP5 抗血清または抗 AQP1 抗血清と4°C、一晩反応させた。その後、ブロット膜を洗浄用バッファーで室温、3回洗浄し、続いて3,000倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG で室温、1時間反応させた。ブロット膜は洗浄用バッファーで室温、15分間1回、つづいて5分間2回洗浄した後、ECL ウェスタンブロットティング検出試薬に反応させ、X-線フィルムに露光させた。なお、検出バンドの特異性は抗 AQP5 抗血清および抗 AQP1 抗血清を抗原 C-末端ペプチド (AQP5: NH<sub>2</sub>-CDHREERKKTIELTAH-COOH, AQP1: NH<sub>2</sub>-CEEYDLADDINSRVEMKPK-COOH) とそれぞれ最終濃度、40 µg/ml で吸収した抗血清を使用し確認した。

#### 8. カテプシン酵素活性の測定

Baskin-Beyら<sup>33)</sup>の方法に従い、カテプシン酵素活性測定用サンプルを調製した。すなわち、顎下腺をネンブータル麻酔下で (50 mg/kg 体重, *i.p.*)、動物から摘出し、ただちに15 ml のガラスホモジナイザーで、9倍量のバッファー (70 mM ショ糖, 220 mM マンニトール, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4) でホモジナイズした。600 x g, 15分間の遠心後、上清を回収し、凍結 (-80°C)・融解 (室温) を3回繰り返した。Percoll 密度勾配遠心法で分離した顎下腺腺房細胞も同様に凍結・融解を繰り返し、カテプシン酵素活性測定用サンプルを調製した。

Yasudaら<sup>34)</sup>の方法により、3種類の基質 (Z-Arg-Arg-MCA, MOCac-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys (Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub> および MOCac-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys (Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>) を用いて、それぞれ、カテプシン B 活性、カテプシン D + E 活性およびカテプシン E 活性を測定した。すべての基質を DMSO で 1 mM 濃度に溶解し、基質原液とした。カテプシン D + E およびカテプシン E 活性測定の反応液は986 µl のバッファー (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0), 100 mM NaCl) に対して4 µl の 1 mM 基質原液と10 µl のサンプルを混和して、総量を1 ml とした。カテプシン B 活性測定の反応液は980 µl のバッファー (100 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10% 蔗糖 (W/V), 10 mM DTT) に10 µl の 1 mM 基質原液と10 µl のサンプルを混合して、総量を1 ml とした。いずれの活性測定もサンプル添加により反応を開始し、反応開始後、ただちに基質の蛍光変化を蛍光光度計 F-4500 (日立, 東京) により、経時的に測定した。測定に用いた波長はカテプシン D + E とカテプシン E の場合は励起波長=328 nm, 蛍光波長=393 nm, カテプシン B の場合は励起波長=380 nm, 蛍光波長=460 nm であった。それぞれ 0.1 µM の MOCac-Pro-Leu-Gly 溶液と10 µM AMC 溶液を標準溶液として用い、各カテプシン活性を算出した。

#### 9. プロテアソーム酵素活性の測定

Bardag-Gorceら<sup>35)</sup>の方法に従い、プロテアソーム酵素活性測定用のサンプルを調製した。すなわち、顎下腺を9倍量のバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10%グリセロール, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2.5 µM ペプスタチン A) でホモジナイズした後、105,000 x g で1時間の遠心分離の後、上清をプロテアソーム酵素活性の測定用試料とした。酵素活性の測定はTsukaharaら<sup>36)</sup>の方法にしたがって行った。基質の Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を DMSO で10 mM 濃度に溶解し、基質原液とした。酵素反応は980 µl の50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に、10 µl の基質原液と10 µl のサンプルを混和し、最終容量を1 ml とした。前述の蛍光光度計により、反応開始後直ちに蛍光の経時変化を測定

した (励起波長=380 nm, 蛍光波長=460 nm)。また, 10  $\mu$ M AMC 溶液を標準溶液として, プロテアソーム活性を算出した。

### 10. 画像解析および統計分析

ウェスタンブロットリングおよびノーザンブロットリングの画像データは画像解析ソフト, NIH Image で処理して数値化した。副交感神経切除後の AQP5 蛋白質経時変化の実験の解析には one-way ANOVA を適用し, Tukey 検定を post-hoc test として行った。

その他の実験結果の統計処理は Mann-Whitney の U 検定により行った。U-test の結果に標準誤差も付記した。

## 結果

### 1. AQP5 発現に対する副交感神経切除と交感神経切除の影響

自律神経系が顎下腺の AQP5 の機能または発現にどのように関与するかを解明するために, 顎下腺水チャンネル蛋白質 AQP5 発現に対する副交感神経切除と交感神経切除の影響を解析した。まず, 副交感神経 (鼓索神経) を切除したラットにおける顎下腺重量と AQP5 蛋白質レベルを解析した。その結果, 副交感神経切除を行った場合, 術側の顎下腺相対重量 (腺重量/体重) は直ちに減少し, 術後 1 週以降 4 週までにおいて対照側の約 60% で推移した。この術側と対照側での腺相対重量の違いには有意差が認められた ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ , 図 1a)。また, 術側の対照側に対する AQP5 蛋白質レベルの相対率は術後徐々に減少し, 対照側との有意差 ( $p < 0.05$ ) が術後 2 週目から認められ, 4 週目にはこの率は対照側の  $37 \pm 9.45\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) にまで減少した (図 1b)。なお本実験で用いた抗 AQP5 抗体が, ウェスタンブロットリングにおいて AQP5 を特異的に認識していることはペプチド吸収実験 (前報<sup>37)</sup> および図 1b の P-Ab のレーンより明らかである。

次に, AQP5 と同様, 顎下腺での発現が知られている AQP1 の副交感神経切除による影響について解析した。本実験で用いた抗 AQP1 抗体もウェスタンブロットリングにおいて AQP1 を特異的に認識した<sup>37)</sup> (図 2a, P-Ab のレーン)。AQP1 発現レベルは術後 4 週目においても有意に減少しなかった (図 2a)。本実験において, 顎下腺相対重量は術後 4 週目で対照側の  $62.8 \pm 1.79\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) に減少したことから, 神経切除は正しく行われたことが確認された。また, 交感神経切除の顎下腺 AQP5 に対する影響についても解析した。図 2b に示すように, 交感神経切除後 4 週において, 顎下腺相対重量 (腺重量/体重) は対照側の約  $81.00 \pm 3.61\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) にまで減少したが, AQP5 蛋白質発現レベルに顕著な差が認められなかった。以上のことから, 顎下腺の AQP5 蛋白質発現レベルは, 交感神経系ではなく, 副交感神経系により制御されている可能性が考えられた。

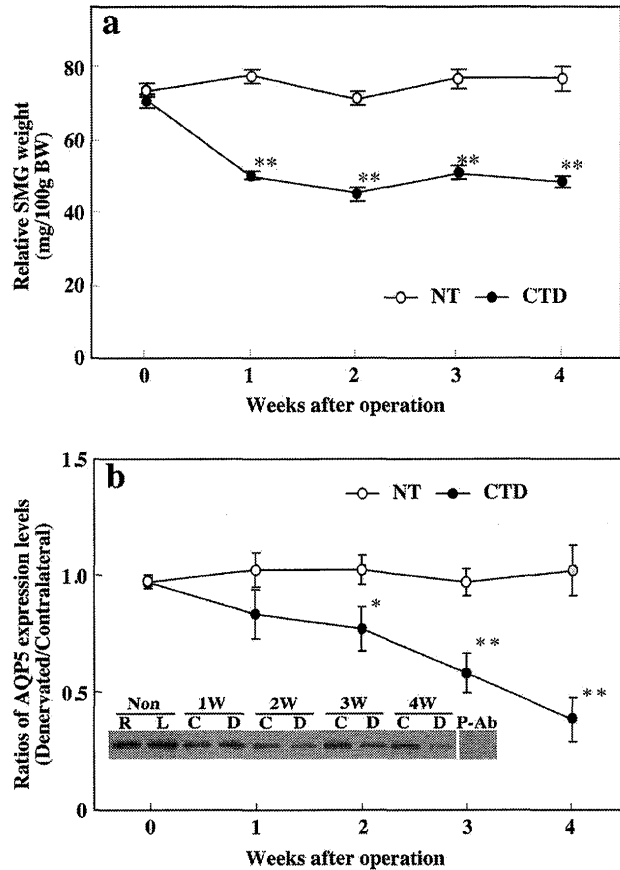


図 1 ラット顎下腺に対する副交感神経切除の影響。NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経 (副交感神経) 切除; P-Ab, ペプチド吸収した抗 AQP5 抗体と反応させた無処置群試料。L, 左側; R, 右側; D, 術側; C, 対照側。副交感神経切除はネブタール麻酔下, 左側鼓索神経の切断により行った。対側神経 (対照) は無処置とした。a, 顎下腺重量に対する影響。b, ウェスタンブロットリング分析結果を画像解析ソフト, NIH Image で数値化し, 手術側と対照側の AQP5 蛋白質発現レベルの相対比を示した。結果は 1 群 5 匹の平均値  $\pm$  S.E.M. を示す。0 週の 2 値の間に有意差が認められなかったため, 無処置群と手術群の間で, 一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。無処置群の値の間には有意差を認めなかったが, 手術群では有意差が検出された。そこで, post-hoc test として Turkey の検定を行った。\* $p < 0.05$ , 術前無処置群 (0 週) と比べて有意差が認められる。\*\* $p < 0.01$ , 術前無処置群 (0 週) と比べて有意差が認められる。

### 2. AQP5 および AQP1 発現に対する塩酸セビメリン投与とピロカルピン投与の影響

副交感神経である鼓索神経切除により顎下腺における AQP5 蛋白質発現レベルが減少したことから, ムスカリン刺激が AQP5 蛋白質発現レベルに影響を与える可能

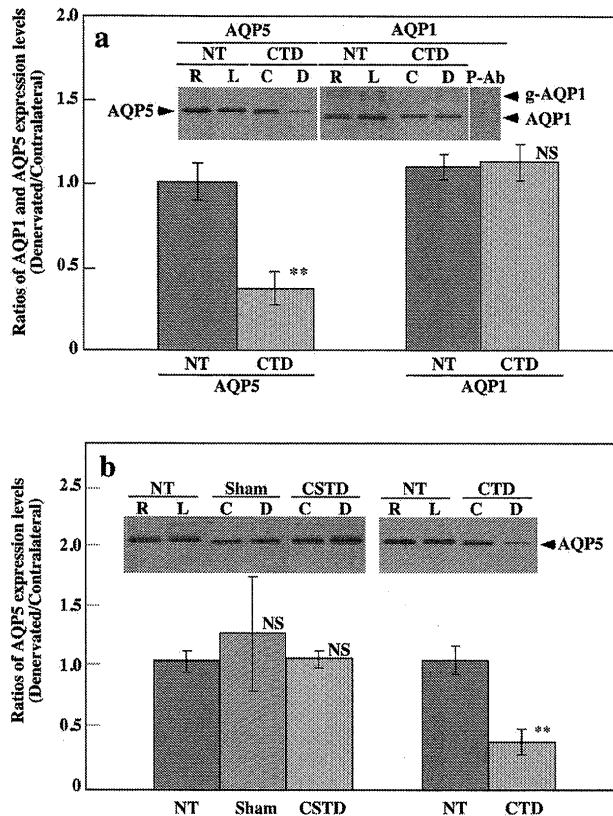


図2 ラット顎下腺 AQP5 および AQP1 蛋白質発現レベルに対する副交感神経切除と交感神経切除の影響。**a**, 副交感神経切除の AQP1/5 に対する影響。**b**, 交感神経切除および副交感神経切除の AQP5 に対する影響。NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経 (副交感神経) 切除; CSTD; 上頸神経 (交感神経) 切除; P-Ab, ペプチド吸収した抗 AQP1 抗体と反応させた無処置群試料。L, 左側; R, 右側; D, 術側; C, 対照側。g-AQP1, グリコシル AQP1。副交感神経切除はネブタール麻酔下, 左側鼓索神経の切断により, また, 交感神経切除は左側上頸神経の切断によりそれぞれ行った。対側神経 (対照) はすべて無処置とした。術後29日目に動物を屠殺し, 実験に供した。切除側と対照側の顎下腺 AQP5 および AQP1 蛋白質発現レベルのウェスタンブローディング分析結果を画像解析ソフト NIH Image で数値化し, その対比を示した。1群5匹の平均値  $\pm$  S.E.M. および Mann-Whitney の U 検定結果を示す。\* $p < 0.05$ , 無処置群と比べて有意差が認められる。NS, 無処置群と比べて有意差が認められない。

性が考えられた。そこで, 副交感神経切除ラット顎下腺の AQP5 と AQP1 蛋白質発現レベルに対する2種類のムスカリンアゴニスト (塩酸セビメリンおよびピロカルピン) の影響について調べた。図3aのウェスタンブローディングの結果に示すように, M3 受容体アゴニストである塩酸セビメリンを, 1日1回, 1週間経口投与 (10 mg/kg 体重) すると, 副交感神経切除によって減少した AQP5 蛋白質発現レベルは有意に ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) 回復した。また, 副交感神経切除による影響が認められなかった AQP1 蛋白質発現レベルは塩酸セビメリン投与により有意に増加した ( $p < 0.05$ , 図3a)。これらの結果は切断された神経の代わりに塩酸セビメリンが伝達物質の役割を果たす可能性を示唆している。ピロカルピンを経口投与 (0.3 mg/kg 体重) しても, 副交感神経切除により減少した AQP5 蛋白質発現レベルは回復しなかった (図3b)。使用したピロカルピン投与量は有意に唾液分泌を促進することが報告されており<sup>38,39)</sup>, 実際に本実験においても対照群の唾液分泌量  $112 \pm 65$  mg/30分間に比較して, 投与群では  $1236 \pm 210$  mg/30分間と顕著な唾液分泌促進作用を示した ( $p < 0.001$ ,  $n=5$ )。なお, 顎下腺相対重量は塩酸セビメリン投与においても, ピロカルピン投与においても増加しなかった (塩酸セビメリンおよびピロカルピン投与群の副交感神経切除を行った対照群に対する比率はそれぞれ  $106.93 \pm 0.02$  および  $95.71 \pm 0.03\%$ , NS,  $n=5$  であった)。

### 3. AQP5 および AQP1 mRNA 発現に対する自律神経切除, およびムスカリンアゴニスト投与の影響

前述のように AQP5 と AQP1 蛋白質発現レベルは副交感神経切除およびムスカリン M3 受容体刺激薬により変化することから, この現象がこれら水チャネル蛋白質 mRNA 発現により調節されているかどうか調べた。まず, DIG 標識化 cDNA プローブを用い, ノーザンブローディングによって副交感神経切除後の AQP5 mRNA 発現レベルを解析した。その結果, AQP5 mRNA に相当する 1.6 kb のバンドがすべてのサンプルにおいて特異的に検出された (図4)。検出されたバンドの強度は対照側と術側の間で大きな差は認められなかった。さらに, 副交感神経切除後のラットに塩酸セビメリン投与を行った場合も, RT-PCR による解析で AQP5 および AQP1 mRNA 発現レベルともに変動しなかった (図5)。この結果はリアルタイム PCR によっても確認された, すなわち, 各群 AQP5 mRNA の相対値 (無処置群を100とした) は無処置群  $100 \pm 0.89\%$ , 副交感神経切除群  $102.54 \pm 1.52\%$ , 塩酸セビメリン投与群  $103.05 \pm 1.40\%$  で, 各群間に有意差は認められなかった ( $n=5$ )。以上のことから, AQP5 蛋白質発現レベルの副交感神経切除による減少および塩酸セビメリン投与による増加は AQP5 mRNA 発現レベルの変動に起因するのではないことが考えられた。

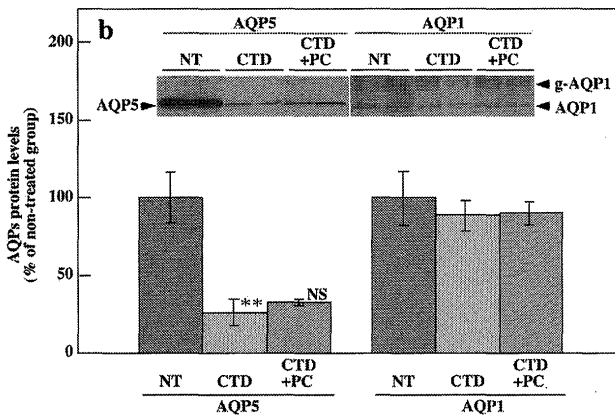
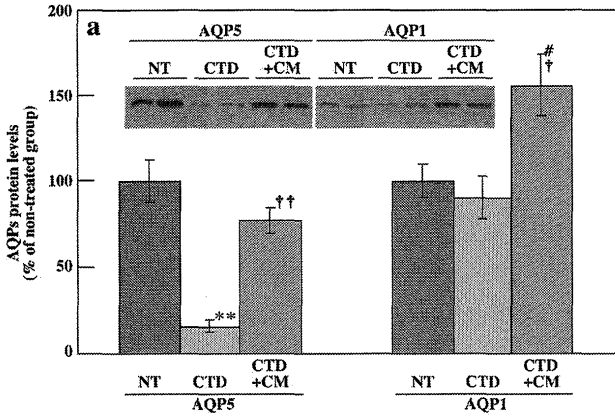


図3 ラット顎下腺 AQP5 と AQP1 蛋白質発現レベルに対する副交感神経切除, 塩酸セビメリンおよびピロカルピンの影響。  
NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経 (副交感神経) 切除; CM, 塩酸セビメリン; PC, ピロカルピン。g-AQP1, グリコシル AQP1。副交感神経切除を両側に行った後, 術後15日目から1日1回, 連続7日間塩酸セビメリン (10 mg/kg 体重) (a) およびピロカルピン (0.3 mg/kg 体重) (b) をそれぞれ経口投与した。AQP5 および AQP1 蛋白質発現レベル分析結果を画像解析ソフト, NIH Image で数値化した。1群5匹の平均値±S.E.M. および Mann-Whitney の U 検定結果を示す。塩酸セビメリンおよびピロカルピン投与によって顎下腺相対重量は対照側と比して, 有意差を認めなかった。  
\*\* $p < 0.01$ , 無処置群と比べて有意差が認められる。  
†† $p < 0.01$ , CTD 群と比べて有意差が認められる。  
† $p < 0.05$ , CTD 群と比べて有意差が認められる。  
# $p < 0.05$ , 無処置群と比べて有意差が認められる。  
N.S., CTD 群と比べて有意差が認められない。

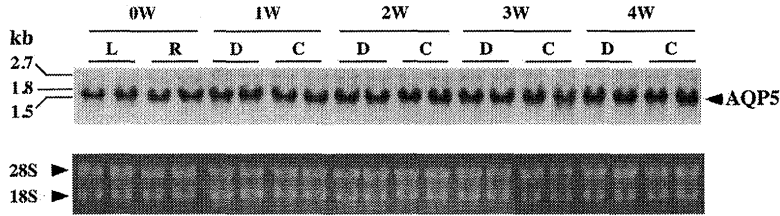


図4 ラット顎下腺 AQP5 mRNA 発現レベルに対する副交感神経切除の影響。  
L, 左側; R, 右側; D, 術側; C, 対照側。CTD, 鼓索神経 (副交感神経) 切除はネブタール麻酔下, 左側鼓索神経の切断により行い, 対側神経は無処置対照とした。ノーザンブローディング分析の結果を画像解析ソフト, NIHImage で処理した結果において, Mann-Whitney の U 検定を行った。術前 (0W) から術後4週 (4W) までに術側と対照側の間でバンドの強度に大きな差は認められない。

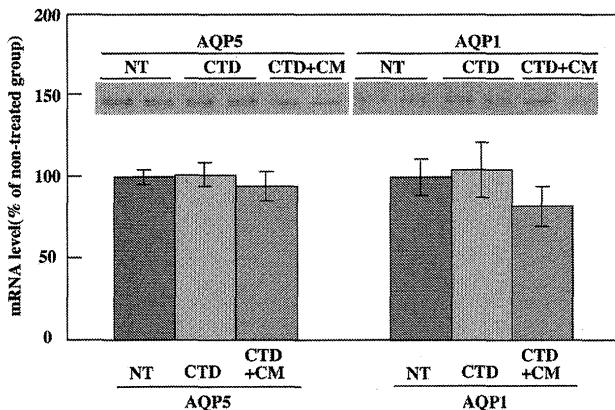


図5 ラット顎下腺 AQP5 mRNA 発現レベルに対する塩酸セビメリン投与の影響。  
NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経 (副交感神経) 切除; CM, 塩酸セビメリン。ネブタール麻酔下, 動物の両側副交感神経切除を行った。術後15日目から1日1回, 連続7日間塩酸セビメリン (10 mg/kg 体重) を経口投与した。すべての動物を術後22日目に屠殺し, 実験に供した。RT-PCR の結果を画像解析ソフト, NIH Image で数値化した。1群5匹の平均値±S.E.M. および Mann-Whitney の U 検定結果を示す。AQP5 mRNA 発現レベルに塩酸セビメリン投与の影響が認められない。



#### 4. 蛋白質代謝レベルに対する自律神経切除およびムスカリンアゴニスト投与の影響

これまでの実験結果から顎下腺 AQP5 蛋白質レベルの副交感神経切除による減少やムスカリンアゴニストによる増加は、同処置が AQP5 遺伝子の転写調節レベルに影響したものではなく、AQP5 蛋白質の翻訳又は代謝レベルを制御した結果である可能性が考えられた。そこで、蛋白質分解系酵素に注目し、副交感神経切除および塩酸セビメリン投与によるリソゾーム酵素（カテプシン B, D および E）とプロテアソームの酵素活性への影響を解析した。リソゾーム酵素、カテプシン D/E の活性は副交感神経切除により2倍以上に上昇し、この上昇は塩酸セビメリン投与により抑制された（図6b）。活性変化の程度はカテプシン D/E ほど顕著ではなかったが、カテ

プシン B および E も同様の变化を示した（図6a, c）。一方、これらの手術や薬物投与はプロテアソームの酵素活性には影響しなかった（図6d）。

顎下腺は主として腺房細胞と導管細胞から構成され、AQP5 は腺房細胞に局在する。しかしリソゾーム酵素はこれら両細胞に存在し、上記変動が腺房細胞に生じる変動を反映したものか不明である。そこで、副交感神経切除および術後塩酸セビメリンを投与したラット顎下腺より Percoll 密度勾配遠心法により導管細胞と腺房細胞を分離し、得られた腺房細胞を用いてカテプシン活性を測定した。分離腺房細胞の純度は、混入した導管細胞の割合を、そのマーカー蛋白質としてカリクレインをウェスタンブロットングにより検出・定量することにより行った。表1に示すように、分離した腺房細胞の純度は91.6

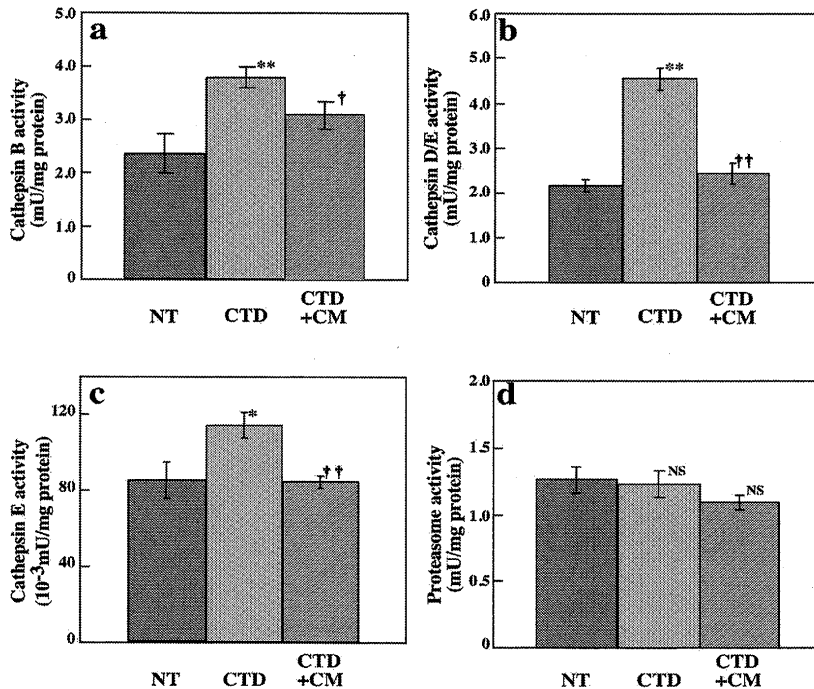


図6 ラット顎下腺におけるカテプシン酵素およびプロテアソームの酵素活性に対する副交感神経切除と塩酸セビメリン投与の影響。  
a, カテプシン B 活性, b, カテプシン D/E 活性, c, カテプシン E 活性, d, プロテアソーム活性。NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経（副交感神経）切除; CM, 塩酸セビメリン。動物の処置および薬物投与は図5と同様に行った。1群5匹の平均値±S.E.M. および Mann-Whitney の U 検定結果を示す。\*\* $p < 0.01$ , 無処置群と比べて有意差が認められる。†† $p < 0.01$ , CTD 群と比べて有意差が認められる。NSn, 無処置群と比べて有意差が認められない。NSc, CTD 群と比べて有意差が認められない。

表1 副交感神経切除および塩酸セビメリン投与ラット顎下腺より分離した腺房細胞のカテプシン活性

	Cathepsin activities (mU/mg protein)		Relative purity of acinar cell samples (%) <sup>c</sup>
	D + E (%)	D <sup>b</sup> (%)	
NT	3.58 ± 0.37 (100 ± 10.33) <sup>a</sup>	3.44 ± 0.36 (100 ± 10.47)	97.06 ± 1.95
CTD	4.61 ± 0.20 (128.77 ± 5.59) <sup>*</sup>	4.51 ± 0.17 (131.10 ± 4.94) <sup>*</sup>	97.20 ± 0.42
CTD + CM	2.74 ± 0.31 (76.54 ± 8.66) <sup>**</sup>	2.69 ± 0.30 (78.20 ± 8.72) <sup>**</sup>	91.56 ± 2.5

NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経（副交感神経）切除; CM, 塩酸セビメリン。1群は5匹とした。a, 無処置群の活性を100%とした。b, カテプシン D/E からカテプシン E の活性を差し引いたカテプシン D の活性。c, 導管細胞のみに存在するカリクレインをマーカーとして、ウェスタンブロットングで分離した腺房細胞の純度を分析した結果。無処置群の導管細胞に存在するカリクレインの量を100%として、腺房細胞に混入した導管細胞を差し引き、腺房細胞の純度とした。1群5匹の平均値と S.E.M. および Mann-Whitney の U 検定による統計処理結果を示す。<sup>\*</sup> $p < 0.05$ , 無処置群と比べて、有意差が認められた。<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , CTD 群と比べて、有意差が認められた。



～97.2%であった。本分離腺房細胞を用い、カテプシン活性を測定した結果、前述の組織サンプルでの測定結果と同様の傾向が認められた。すなわち、副交感神経切除および塩酸セビメリン投与後得た分離腺房細胞においても切除術によりカテプシンD/E活性が上昇し、塩酸セビメリン投与によってこの上昇は回復した。図6および表1の結果は副交感神経切除および塩酸セビメリン投与によるAQP5蛋白質発現レベルの変動はリソゾーム系蛋白質分解酵素、特にカテプシンDが増減することにより制御されている可能性を支持する。さらにこの可能性を検証するために、リソゾームを変性させる作用が報告されているクロロキン<sup>40)</sup>を経口投与(50 mg/kg 体重)し、AQP5蛋白質発現レベルの変動を調べた。その結果、図7に示すように、クロロキン投与はAQP5蛋白質発現レベルを上昇させた。この結果は副交感神経切除によって蛋白質分解系が亢進し、減少したAQP5蛋白質レベルがリソゾームを変性させることによって部分的に回復したためと考えられた。

### 考 察

ラット顎下腺に発現する水チャネルAQP5およびAQP1の自律神経系による調節機構を明らかにするため、副交感神経切除、交感神経切除、およびムスカリン

アゴニストである塩酸セビメリンとピロカルピン投与の影響を調べた。

顎下腺を支配している副交感神経(鼓索神経)を切除すると顎下腺相対重量の減少にともなって、腺AQP5蛋白質レベルが減少した(図1)。手術により腺重量が減少、すなわち腺アトロフィーが進行し、これに基づきAQP5蛋白質レベルが非特異的に減少した可能性が考えられた。しかし、1) AQP5蛋白質レベルの減少と相対重量の減少のタイムコースが異なること、2) 交感神経切除によっても腺相対重量が減少したが、この場合は顎下腺AQP5蛋白質レベルが変化しなかったこと、3) AQP5に関して蛋白質レベルのみが減少し、mRNAレベルは減少しなかったこと、などの所見から、今回観察した副交感神経切除によるAQP5蛋白質の減少は特異的な変化であると考えられた。

副交感神経切除によるAQP5蛋白質レベルの減少速度は極めてゆるやかであった。術後AQP5蛋白質レベルはほぼ直線的に減少し、およそ25日後、レベルは1/2となった。AQP5 mRNAは副交感神経切除により変化しなかったため、AQP5蛋白質の合成速度もこの手術によって変化していないと仮定すると、蛋白質分解系の亢進により合成と代謝分解のバランスが変化し、新たな定常状態へ移行するためAQP5蛋白質レベルが減少したものと考えられる。

副交感神経切除によって減少したAQP5蛋白質レベルはムスカリンアゴニスト、塩酸セビメリンの投与により回復した。これは古典的、常道的な実験であり、このアゴニストが実際にムスカリン受容体を介して作用した結果によることを示唆しているが、この点に関しては、より多くのM3ムスカリンアゴニストやアンタゴニストを用いた実験ならびに、M1-M5ノックアウトマウスを用いた実験により明らかにすることが可能であり、現在この実験を計画している。

Leithら<sup>41)</sup>はプロテアソーム阻害剤によってAQP1蛋白質レベルが上昇することから、AQP1の発現レベルがプロテアソーム系によって制御されると報告しているが、今回の研究では、AQP1蛋白質レベルは副交感神経切除によって変化せず、塩酸セビメリン投与によって上昇した。顎下腺においてAQP1は毛細血管に存在する事が知られており<sup>42)</sup>、通常毛細血管には神経支配が無いため神経切除の効果が出現しなかったと考えられる。一方AQP1レベルは塩酸セビメリン投与によって上昇したがこれに関しては、塩酸セビメリンによるAQP5の誘導の場合と同様にM3受容体を介して現れた現象かどうかについて、上記ノックアウトマウスを用いた実験等によって明らかにする必要がある、現在計画している。

AQP5 mRNAは副交感神経切除によって、また副交感神経切除の後塩酸セビメリンを投与しても変化しなかった。TNF- $\alpha$ 、LPSがAQP5の転写を抑制し<sup>43,44)</sup>、低酸素状態および高浸透圧がその転写を促進する<sup>45)</sup>ことが報

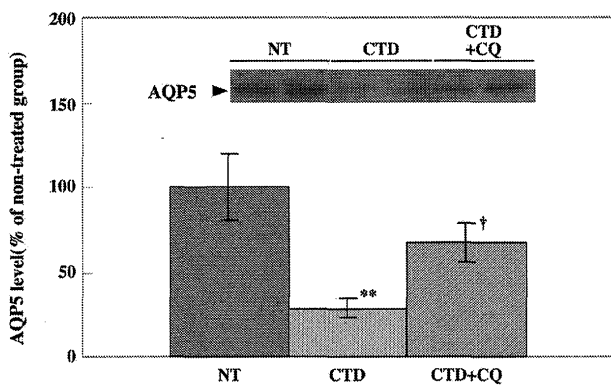


図7 ラット顎下腺AQP5蛋白質発現レベルに対する副交感神経切除とクロロキン投与の影響。

NT, 無処置群; CTD, 鼓索神経(副交感神経)切除; CQ, クロロキン。ネブタール麻酔下、動物の両側副交感神経(鼓索神経)切除を行った。術後15日目から1日1回、連続7日間クロロキン(50 mg/kg 体重)を経口投与した。すべての動物を術後22日目に屠殺し、実験に供した。ウェスタンブロッティング分析の結果を画像解析ソフト、NIHImageで数値化した。1群5匹の平均値±S.E.M.およびMann-WhitneyのU検定結果を示す。\*\*p<0.01, 無処置群と比べて有意差が認められる。†p<0.05, CTD群と比べて有意差が認められる。

告されている。しかし、ムスカリン受容体が関与するシグナル分子により AQP5 遺伝子の転写が制御されるといふ報告はこれまでのところ見られない。本研究においてもこのことは示すことはできなかった。

副交感神経切除および副交感神経切除の後、塩酸セビメリンの投与によって AQP5 mRNA レベルが変化しないにも関わらず AQP5 蛋白質レベルが減少したことから翻訳速度の減少または蛋白質分解系の亢進が考えられた。本研究では、後者、すなわち副交感神経切除ならびに塩酸セビメリン投与が蛋白質分解系に影響した可能性を検証した。

蛋白質代謝系は、一般的にリソゾーム系蛋白質分解酵素およびユビキチン-プロテアソーム系蛋白質分解酵素の2系列が知られている。ユビキチンプロテアソームでは細胞周期制御因子、物質代謝律速酵素、シグナル伝達因子、転写因子、がん遺伝子、がん抑制遺伝子など多岐にわたる分子群が異化代謝される。さらにユビキチンプロテアソーム系は変異・障害をうけた蛋白質あるいは正常な折りたたみ・分子集合に支障をきたした異常蛋白質などを積極的に除去するので、小胞体や細胞質における蛋白質の品質管理機構であると考えられている。一方、リソゾームは外来性（細胞外）および内在性（細胞内）蛋白質を分解する。これらの代謝はそれぞれヘテロファジー（heterophagy, 異食）およびオートファジー（autophagy, 自食）とよばれている。ヘテロファジーによっては主としてリガンドとそれらを結合した受容体が、またオートファジーによっては細胞質の種々の成分が分解される。オートファジーは絶食や飢餓などの条件化で、外来性蛋白質の利用が困難なとき著しく亢進される。本研究において副交感神経切除によってプロテアソーム酵素活性は変化しなかったがリソゾーム酵素の活性上昇が認められた。副交感神経切除によって腺重量および腺房細胞のサイズがともに減少したので腺房細胞のオートファジー亢進が起こったと考えられる。この結果 AQP5 の代謝分解が進んだ可能性が考えられる。

Sidhaye ら<sup>46)</sup> は cAMP によって減少した AQP5 蛋白質レベルがクロロキンによって障害され、元のレベル以上に上昇したことから、AQP5 がリソゾームによって分解される可能性を報告している。また、AQP2, AQP8 などはリソゾーム系酵素によって分解されることが報告されている<sup>47, 48)</sup>。たとえば、MDCK 細胞に発現させた AQP2 はユビキチン化されることによってリソゾームによる代謝分解の感受性がより上昇する<sup>47)</sup> こと、肝細胞においてエストロゲンによる AQP8 の減少はリソゾーム酵素によって誘導される<sup>48)</sup> ことなどが、報告されている。これらの研究結果も今回の研究結果を支持すると考えられる。

本研究の結果からカテプシン D 等が唾液腺 AQP5 の蛋白質分解に関与している可能性が示唆されたので、現在カテプシン D ノックアウトマウスおよびカテプシン

E ノックアウトマウスを用いてこれらの動物における唾液腺 AQP5 レベルを正常マウスと比較検討している。さらに、ノックアウトマウスにおいて副交感神経切除および塩酸セビメリン投与が AQP5 レベルに影響しない可能性を明らかにし、リソゾーム系酵素が唾液腺における AQP5 蛋白質レベルの制御に関与していることを直接証明する予定である。

現在、唾液腺抽出液、純化カテプシン、各種カテプシン阻害剤および全膜蛋白質を用いてカテプシン（特にカテプシン D）が *in vitro* において膜標品中の AQP5 を代謝分解する可能性を検証しつつある。

## 結 論

顎下腺にある AQPs の発現レベルに対する副交感神経切除および塩酸セビメリン投与の影響は、mRNA の転写調節によるものではなく、リソゾーム酵素、主にカテプシン D の活性調節によって制御されている可能性が強いと考えられた。

## 謝 辞

本研究を助成していただいた日中医学協会に厚くお礼申し上げます。本研究の助成をしていただき、塩酸セビメリンを提供いただいた第一製薬（株）に感謝申し上げます。自律神経切除術について技術的にご指導して頂きました岡山大学大学院医歯学総合研究科口腔生理学分野・松尾龍二教授に深謝いたします。

終始御指導御校閲を賜った口腔分子生理学分野細井和雄教授に深甚なる謝意を表しますとともに、数々の御指導と御援助を戴いた金森憲雄助教授、赤松徹也先生に深謝致します。また、御助言を戴いた姚陳娟博士に感謝致します。御協力を戴いた口腔分子生理学分野松尾真介技術員、Nunuk Purwanti さん、Mileva Karabasil さん、Ahmad Azlina さんに感謝致します。

## References

- 1) Agre P: Molecular physiology of water transport: aquaporin nomenclature workshop: Mammalian aquaporin. *Biol Cell* 89, 225-257 (1997)
- 2) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F and Sasaki S: Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* 272, 20782-20786 (1997)
- 3) Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F and Sasaki S: Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not glycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 268-274 (1998)
- 4) Ishibashi K, Kuwahara M, Kageyama Y, Tohsaka A, Marumo F and Sasaki S: Cloning and functional

- expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 714-718 (1997)
- 5) Koyama Y, Yamamoto T, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K and Kihara I: Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J Biol Chem* 272, 30329-30333 (1997)
- 6) Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S and Ishibashi K: Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 832-838 (2005)
- 7) Agre P, Bonhiver M and Borgnia MJ: The aquaporin, blueprints for cellular plumbing system. *J Biol Chem* 273, 14659-14662 (1998)
- 8) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F and Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361, 549-552 (1993)
- 9) Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T and Marumo F: Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6269-6273 (1994)
- 10) Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM and Agre P: Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 13052-13056 (1994)
- 11) Preston GM and Agre P: Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kD: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11110-11114 (1991)
- 12) Raina S, Preston GM, Guggino WB and Agre P: Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal and respiratory tissues. *J Biol Chem* 270, 1908-1912 (1995)
- 13) Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P and Engel A: The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 387, 624-627 (1997)
- 14) Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S and Imai M: Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaporin. *Biochim Biophys Acta* 1576, 335-340 (2002)
- 15) Preston GM, Carroll TP, Guggino WB and Agre P: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387, (1992)
- 16) Kumagami H, Loewenheim H, Beiz E, Wild K, Schwarz H, Yamashita K, Schultz J, Paysan J, Zenner H-P and Ruppertsberg JP: The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 436, 970-975 (1998)
- 17) Nielsen S, Chou C-L, Marples D, Christensen EI, Kishore BK and Knepper MA: Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1013-1017 (1995)
- 18) Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH and van Oost BA: Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264, 92-95 (1994)
- 19) Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F and Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361, 549-552, (1993)
- 20) Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA and Harris HW: Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11663-11667 (1993)
- 21) Sasaki S, Ishibashi K and Marumo F: Aquaporin-2 and -3: representatives of two subgroups of the aquaporin family colocalized in the kidney collecting duct. *Annu Rev Physiol* 60, 199-220 (1998)
- 22) Morello J and Bichet DG: Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 63, 607-630 (2001)
- 23) Parvin MN, Tsumura K, Akamatsu T, Kanamori N and Hosoi K: Expression and localization of AQP5 in the stomach and duodenum of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1542, 116-124 (2002)
- 24) Parvin MN, Kurabuchi S, Murdiastuti K, Yao C, Kosugi-Tanaka C, Akamatsu T, Kanamori N and Hosoi K: Subcellular redistribution of AQP5 by vasoactive intestinal polypeptide in the Brunner's gland of the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G1283-G1291 (2005)
- 25) Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ and Verkman AS: Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274, 20071-20074 (1999)
- 26) Murdiastuti K, Purwanti N, Karabasil MR, Li X, Yao C, Akamatsu T, Kanamori N and Hosoi K: A naturally occurring point mutation in the rat aquaporin 5 gene, influencing its protein production by and secretion of

- water from salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G1081-1088 (2006)
- 27) Bradley RM: "Salivary secretion". *Essentials of oral physiology*. Bradley, RM, eds. Second ed. St Louis Mo. Mosby-Year Book, Inc. 1995. pp.161-186.
  - 28) Tada J, Sawa T, Yamanaka N, Shono M, Akamatsu T, Tsumura K, Parvin MN, Kanamori N and Hosoi K: Involvement of vesicle-cytoskeleton interaction in AQP5 trafficking in AQP5-gene-transfected HSG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 443-447 (1999)
  - 29) Yao C, Li X, Murdiastuti K, Kosugi-Tanaka C, Akamatsu T, Kanamori N and Hosoi K: Lipopolysaccharide-induced elevation and secretion of interleukin-1 $\beta$  in the submandibular gland of male mice. *Immunology*, 116, 213-222 (2005)
  - 30) Vincent R and Nadeau D: Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and organelles. *Anal Biochem* 141, 322-328 (1984)
  - 31) King LS, Nielsen S and Agre P: Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 273, C1541-C1548 (1997)
  - 32) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)
  - 33) Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL and Gores GJ: Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G396-G402 (2005)
  - 34) Yasuda Y, Kageyama T, Akamine A, Shibata M, Kominami E, Uchiyama Y and Yamamoto K: Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *J Biochem* 125, 1137-1143 (1999)
  - 35) Bardag-Gorce F, Li J, French BA and French SW: The effect of ethanol-induced CYP2E1 on proteasome activity: the role of 4-hydroxynonenal. *Exp Mol Pathol* 78, 109-111 (2005)
  - 36) Tsukahara T, Ishiura S and Sugita H: An ATP-dependent protease and ingensin, the multicatalytic proteinase, in K562 cells. *Eur J Biochem* 177, 261-266 (1998)
  - 37) Murdiastuti K, Miki O, Yao C, Purwanti N, Kosugi-Tanaka C, Akamatsu T, Kanamori N and Hosoi K: Divergent expression and localization of aquaporin 5, an exocrine-type water channel, in the submandibular gland of Sprague-Dawley rats. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 445, 405-412 (2002)
  - 38) Iwabuchi Y and Masuhara T: Sialogogic activities of SNI-2011 compared with those of pilocarpine and McN-A-343 in rat salivary gland: Identification of a potential therapeutic agent for treatment of Sjögren's syndrome. *Gen Pharmacol* 25, 123-129 (1994)
  - 39) Omori Y, Asari T, Maruyama K, Kusama H, Kojima M and Shibata N: Effects of pilocarpine hydrochloride and cevimeline on submandibular/sublingual salivation in rat xerostomia model produced by X-ray irradiation. *Arzneimittelforschung* 53, 342-350 (2003)
  - 40) Sundelin SP and Terman A: Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 110, 481-489 (2002)
  - 41) Leith V, Agre P and King LS: Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2894-2898 (2001)
  - 42) Li J, Nielsen S, Dai Y, Lazowski KW, Christensen EI, Tabak LA and Baum BJ: Examination of rat salivary glands for the presence of the aquaporin CHIP. *Pflügers Arch* 428, 455-460 (1994)
  - 43) Towner JE, Krane CM, Bachurski CJ and Menon AG: Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 276, 18657-18664 (2001)
  - 44) Xie YP, Chen CP, Wang JC, Qian GS, Wang YD and Xiao ZL: Experimental study on the expression and function of aquaporin-1 and aquaporin-5 in rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 28, 385-389 (2005)
  - 45) Zhou B, Ann DK, Li X, Kim KJ, Lin H, Minoo P, Crandall ED and Borok Z: Hypertonic induction of aquaporin-5: novel role of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1280-C1290 (2007)
  - 46) Sidhaye V, Hoffert JD and King LS: cAMP has distinct acute and chronic effects on aquaporin-5 in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 3590-3596 (2005)
  - 47) Kamsteeg EJ, Hendriks G, Boone M, Konings IBM, Oorschot V, Sluijs P, Klumperman J and Deen PMT: Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18344-18349 (2006)
  - 48) Carreras FI, Lehmann GL, Ferri D, Tioni MF, Calamita G and Marinelli RA: Defective hepatocyte aquaporin-8 expression and reduced canalicular membrane water permeability in eatrogen-induced cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G905-G912 (2007)